



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **03200797 A**(43) Date of publication of application: **02 . 09 . 91**

(51) Int. Cl.

C07K 13/00
C12N 15/31
// C12P 21/02
(C12N 15/31 , C12R 1:19), (C12P
21/02 , C12R 1:19)

(21) Application number: **01135781**(22) Date of filing: **31 . 05 . 89**(71) Applicant: **KAJI AKIRA**(72) Inventor: **KAJI AKIRA**(54) **NEW PEPTIDE AND NEW DNA**

objective peptide expressed by the formula.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

NEW MATERIAL: A peptide having an amino acid sequence expressed by the formula.

USE: A protein synthesis promoter for promoting elimination of a ribosome from mRNA in synthesizing a protein by Escherichia coli.

PREPARATION: For example, a gene capable of coding a peptide (RRF) expressed by the formula is collected from regions 2 to 6 in linking F-pilli of Escherichia coli to carry out treatment with a restriction enzyme. The resultant gene is then linked to an expression vector prepared by treating a plasmid proliferative in the Escherichia coli with a restriction enzyme to provide a recombinant plasmid, which is then inserted into a host such as the Escherichia coli to carry out transformation. The obtained transformant is subsequently cultured using a high phosphoric acid-casamino acid culture medium, etc. After completing the culturing, the Escherichia coli is ultrasonically crushed and centrifuged to collect a supernatant as a water-soluble fraction. DNA, RNA, etc., are precipitated and removed to collect a crude fraction by precipitation with ammonium sulfate. The collected fraction is then subjected to chromatography and purified to afford the

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
 LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
 ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal
 GluTyrTyrGlyThrProThrProLeuArgGluLeuAlaSer
 ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
 AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
 SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
 ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
 LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
 AlaValArgAsnValArgArgAspAlaAsnAspLysValLys
 AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspAspArg
 ArgSerGlnAspAspValGlnLysLeuThrAspAlaAlaIle
 LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
 MetGlnPhe

⑫ 公開特許公報(A) 平3-200797

⑤ Int. Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成3年(1991)9月2日
 C 07 K 13/00 ZNA 8619-4H
 C 12 N 15/31
 // C 12 P 21/02 C 8214-4B
 (C 12 N 15/31)
 (C 12 R 1:19)
 (C 12 P 21/02)
 C 12 R 1:19
 8717-4B C 12 N 15/00 A
 審査請求 未請求 請求項の数 3 (全5頁)

⑥ 発明の名称 新規ペプチドならびに新規DNA

⑦ 特 願 平1-135781

⑧ 出 願 平1(1989)5月31日

⑨ 発 明 者 梶

昭 東京都東久留米市大門町1-1-9

⑩ 出 願 人 梶

昭 東京都東久留米市大門町1-1-9

明 和 查

1. 発明の名称

新規ペプチドならびに新規DNA

2. 特許請求の範囲

(1) 下記のアミノ酸配列

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
 LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
 ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal
 GluTyrTyrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
 ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
 AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
 SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
 ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
 LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
 AlaValArgAsnValArgArgAspAlaAsnAspLysValLys
 AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspAspArg
 ArgSerGlnAspAspValGlnLysLeuThrAspAlaAlaIle
 LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
 MetGlnPhe

からなる新規ペプチド。

(2) 下記のアミノ酸配列

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
 LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
 ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal
 GluTyrTyrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
 ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
 AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
 SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
 ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
 LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
 AlaValArgAsnValArgArgAspAlaAsnAspLysValLys
 AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspAspArg
 ArgSerGlnAspAspValGlnLysLeuThrAspAlaAlaIle
 LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
 MetGlnPhe

からなるペプチドをコードする新規DNA。

(3) 下記のアミノ酸配列

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
 LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
 ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal

GluTyrTyrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
AlaValArgAsnValArgArgAspAlaAsnAspLysValLys
AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspAspArg
ArgSerGlnAspAspValGlnLysLeuThrAspAlaAlaIle
LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
MetGlnPhe

からなるペプチドをコードする新規DNAが

5'-GTGATTAGCGATATCAGAAAAGATGCTGAAGTACGCATG
GACAAATGCGTAGAAGCGTTCAAAACCCAAATCAGCAAAATA
CGCACGGGTCGTGCTTCTCCAGCCTGCTGGATGGCATTGTC
GTGCAATATTACGGCAGCCGACGCCGCTGCGTCAGCTGGCA
AGCGTAACGGTAGAAGATTCCCGTACACTGAAAATCAACGTG
TTTGATCGTTCAATGCTCTCCGGCCGTTGAAAAAGCGATTATG
GCGTCCGATCTTGGCCTGAACCCGAACCTCTCGGGTAGCGAC
ATCCGTGTTCCGCTGCCGCCGCTGACGGAAGAACGTCGTAAA

本発明者は、既に、本発明者等が報告したアッ
セイ方法並びに精製方法 (Biochemistry, 11, 4037
-4044 (1972)) により、その活性を確かめながら、
精製し、N末端部分のアミノ酸配列を分析し、その
アミノ酸配列を基に、DNAプローブを合成し、大
腸菌の遺伝子バンクよりスクリーニングし、適当
なベクターに組み込み、大腸菌で発現させること
に成功し、本発明のペプチドを提供するに至った。

即ち、本発明は、下記のアミノ酸配列

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal
GluTyrTyrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
AlaValArgAsnValArgArgAspAlaAsnAspLysValLys
AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspAspArg

GATCTGACCAAAATCGTTCGTGGTGAAGCAGAACAAGCGCGT
GTTGCAGTACGTAACGTGCGTGTGACGGCAACGACAAAGTG
AAAGCACTGTTGAAAGATAAAGAGATCAGCGAAGACCACGAT
CGCCGTTCTCAGGACGATGTACAGAACTGACTGATGCTGCA
ATCAAGAAAATTGAAGCGCGCTGGCAGACAAAGAAGCAGAA
CTGATGCAGTTCTGA

である新規DNA。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明のペプチド(RRF)は、大腸菌における蛋
白合成過程において、リボゾームのmRNAからの離
脱を促進するペプチドであり、生体外でのペプ
チド合成を工業的に行う際に、その重要性が期待で
きるものである。

[従来の技術および課題]

従来、その存在と機能については、本発明者等
が報告していた (Biochemistry, 11, 4037-4044 (19
72)) が、RRFを大量に生産せしめた例はなく、そ
の選択的大量生産が求められていた。

[課題を解決するための手段]

ArgSerGlnAspAspValGlnLysLeuThrAspAlaAlaIle
LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
MetGlnPhe

からなる新規ペプチドおよびその構造遺伝子な
らびに製造方法である。

上述した本発明のペプチドアミノ酸配列および
以下の説明においては、Valは、バリン、Argは、
アルギニン、Serは、セリン、Thrは、スレオニン、
Proは、プロリン、Lysは、リジン、Alaは、アラ
ニン、Hisは、ヒスチジン、Asnは、アスパラギン、
Glnは、グルタミン、Gluは、グルタミン酸、Gly
は、グリシン、Leuは、ロイシン、Aspは、アスパ
ラギン酸、Tyrは、チロシン、Ileは、イソロイシ
ン、Pheは、フェニルアラニン、Cysは、システイ
ンの各残基を意味する。

本発明の新規ペプチドは、大腸菌等を用いた遺
伝子組換え法により、容易に大量生産できるとい
う特徴を有しているので、遺伝子組換え法により
生産するのが好ましい。

以下に、本発明の新規ペプチドの製造方法につ

いて、説明する。

1) 構造遺伝子の入手

本発明のペプチドの構造遺伝子を例えばグリーンライブラリー例えば、ClarkとCarbonの遺伝子バンク (Cell, 9, 91-99 (1976)) より、適当なプローブを用いて、釣取するのが好ましい。特に、本発明者は、RRFの遺伝子が大腸菌のF線毛接合時の2から6分領域に存在することを確認しており、この部分の遺伝子バンクより釣取することが特に好ましい。

2) 発現ベクターの調製

本発明においてはその発現のためのプロモーター等の発現システムを有し、大腸菌内で増殖可能なさまざまなプラスミドを用いることが可能であり、それらのプラスミドを調製するにあたっては、公知の富法に従って行うことができるが、市販の発現プラスミドを利用することも可能である。

これらのプラスミドに前記の本発明のペプチドの構造遺伝子を含むDNAを一般の遺伝子組換えの操作によって組込むことにより、プラスミド組換

え分子を構築する。

3) 組換え体の作成

常法にしたがい、この組み換え分子を用いて適当な大腸菌株を形質転換し、形質転換体を得る。

4) ペプチドの生産

形質転換体の培養に当たっては、L-培地、M9培地、M9-カザミノ酸培地、高リン酸培地、高リン酸-カザミノ酸培地等を用いることができ、これらにおける培養により本発明のペプチドを量産することができる。

5) ペプチドの精製

大腸菌で発現したペプチドは、大腸菌を超音波破砕後、遠心分離することによって、水溶性画分としての上清を得、これにポリエチレニミン等を加え、DNA、RNA、リゾソームを沈殿させて除き遠心分離して上清を得る。この上清より、緩安沈殿の手法を用い、粗分画を集め、更に透析、陰イオンクロマトグラフィー等を行い精製できる。

更に純度を上げるため、特異抗体を用いたアフニティークロマトグラフに付すのも好ましい。

以下、本発明について、実施例を示し、説明する。

【実施例】

1. RRFcDNAを含むプラスミドの単離

本発明者等の報告 (Biochemistry, 11, 4037-4044 (1972)) したポリゾームを用いたRRF活性のアッセイ方法を指標として、E. coli MRE600株のポリゾーム洗浄液より本発明者等の報告 (Biochemistry, 11, 4037-4044 (1972)) した精製方法でRRF蛋白を精製して、NaDodSO₄を含有するポリアクリルアミドゲル電気泳動により、その純度を確かめた。精製したRRF蛋白 460μgをBrCN 420μgとを室温、避光下で、80%ギ酸 50μl中で24時間反応させた。この反応を450μlの精製水を加えて停止せしめ、凍結乾燥後、再度0.1%トリフロ酢酸含有 8M尿素水溶液 50μlに溶解し、セファデックスG50カラムに付し、0.1%トリフロ酢酸で溶出して、2種のフラクションを得、それぞれ、凍結乾燥し、アミノ酸配列分析に供した。これを、プロテインシーケンサー (アブライドバイオシ

ステム 470A) に付し、一方のフラクションのN末端シーケンスが、AlaSerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIleArgValProLeuProProLeuであることを確かめ、DNA合成機 (アブライドバイオシステム社製) により大腸菌の利用コドンより推定した3'-TACCGCAGACTGGACCCAGACTTGGCTTGCCACGCCCAAGACTGTA(47塩基)を合成し、RRF遺伝子のプローブとし、5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼ及び (γ-³²P)ATPを用いて³²Pラベルした。ClarkとCarbonの遺伝子バンク (Cell, 9, 91-99) の内、0-10分領域から20クローンを選抜し、アルカリ融解を用いたミニブレバレーション法 (Maniatis T. 他, Molecular cloning (1982)) でそれぞれのプラスミドを得た。サザンハイブリダイズ法 (Southern E. M., J. Mol. Biol., 98, 503-517 (1975)) に従い、このプラスミドをアガロースゲルよりNYTRAN膜に移し、ブレハイブリダイズした後、5×Denhardt's溶液、0.5% NaDodSO₄、100μg/ml 酵母 tRNA、前述の合成プローブ (47塩基) (0.6×10⁶ cpm/3.3μole) を含有する6×SSPE (1×SSPE: 0.18M

NaCl, 0.04M リン酸ナトリウム (pH. 7.7), 1mM EDTA) 溶液 2ml 中で、37℃、20時間ハイブリダイズした後、1% NaDodSO₄ を含有する1×SSPE溶液で洗浄した結果、プラスミド pLC6-32 に RRF 遺伝子が存在することを確認し、制限酵素 EcoRI で消化して 2.2Kb の遺伝子フラグメントを回収した。このフラグメントには、RRF の開始コドンから終止コドンまで (558塩基) が完全に含まれていた。

2. 遺伝子の発現

pLC 6-32 を有する E. coli JA 200 をコリシン 1 unit/ml を含有する 1.5ml の L-培地で定常期まで培養した。Maniatis らの方法 (Molecular cloning (1982)) でこの大腸菌よりプラスミドを抽出し、このプラスミドを 10mM トリス塩酸 (pH 8.0)、1mM EDTA からなる溶液 100μl に 2.5 OD となるように溶解し、この溶液よりプラスミド 2.0 OD 相当量を取り、EcoRI 60 unit と混合し、BRL マニュアル記載の反応溶液 100μl 中で 37℃、3時間反応させ、500 mM EDTA 10μl をくわえて、反応終了後、0.3% 酢酸

更に、上記の 2.2kb のフラグメントのうちの SmaI および EcoRI 消化フラグメント (0.9kb) を同様に pUC19 ベクターにライゲーションしてトランスフォームした場合は、大腸菌の総蛋白の 90% 以上が RRF であった。

これらの大腸菌の抽出液の RRF 活性を測定したところ、通常の大腸菌に比べ圧倒的に高い RRF 活性が認められた。

3. RRF の精製

この菌体液より、本発明者等の報告 (Biochemistry, 11, 4037-4044 (1972)) したポリゾームを用いた RRF 活性のアッセイ方法を指標として、DH5a/pRR1 の菌体溶出液より、本発明者等の報告 (Biochemistry, 11, 4037-4044 (1972)) した精製方法で RRF 蛋白 (分子量約 20,000 グルトン) を精製した。

4. DNA シークエンスの解析

また、pRR1 を制限酵素 EcoRI、SmaI、Sau3AI お

ナトリウム存在下、2倍量のエタノールで DNA を沈殿させた。この DNA を 1.2% アガロースゲル電気泳動に付し、2.2kb のフラグメントを得た。Dunn らのゲル内ライゲーション法 (Biotechniques, 5, 62-67 (1987)) により、このフラグメントとあらかじめ EcoRI 消化し、牛小腸ホスファターゼで処理した pUC 19 ベクターをライゲーションし、このライゲーション混合物 10μl を E. coli DH5a 50μl にトランスフォームし、50μg/ml アンピシリン、2% X-Gal 50μl を含有する L-培地プレートに接種した。白色のコロニーとして、プラスミドを含む菌を得。これらのうちから、サザン法により、pUC 19 に RRF の遺伝子を含む 2.2kb のプラスミドの組み込まれたプラスミド (pRR1) を含む菌 (DH5a/pRR1) を得た。この菌を培養し、Caskey らの方法 (J. Bacteriol., 158, 365-368 (1984)) で調製した菌体分解物の総蛋白を SDS 電気泳動に付し、ゲルをクマシブルー染色し、Bradford の方法 (Anal. Biochem., 72, 248-254) で定量した。ここで、大腸菌の総蛋白の 70% 以上が RRF であった。

および BglI で消化してえられたフラグメントについてジデオキシ法により DNA シークエンス分析を行ったところ、RRF の開始コドンから終止コドンまでの DNA シークエンスは、

5'-GTGATTAGCGATATCAGAAAAGATGCTGAAGTACGCATG
GACAAATGCGTAGAAGCGTTCAAAACCCAAATCAGCAAAATA
CGCACGGGTCGTGCTTCTCCAGCGCTGCGATGCGATTGTC
GTGGAATATTACGGCACGCCGACGCCGCTGCGTCAGCTGGCA
AGCGTAACGGTAGAAGATTCCCGTACACTGAAAATCAACGTG
TTTGATCGTTCAATGTCTCCGGCCGTTGAAAAACGGATTATG
GCGTCCGATCTTGCGCTGAACCCGAACTCTGCGGGTAGCGAC
ATCCGTGTTCCGCTGCCCGCGCTGACGGAAGAAGCGTAA
GATCTGACCAAAATCGTTGCTGGTGAAGCAGAACAGCGCGT
GTTGCAGTACGTAACGTCGCTGCGTACGCCAAGCAGCAAAAGTG
AAAGCACTGTTGAAAGATAAAGAGATCAGCGAAGACGACGAT
CGCCGTTCTCAGGACGATGTACAGAACTGACTGATGCTGCA
ATCAAGAAAATTGAAGCGCGCTGGCAGACAAAAGACAGAA
CTGATGCAGTTCTGA

の (558塩基) であり、その DNA シークエンスに対応するアミノ酸シークエンスは、

MetIleSerAspIleArgLysAspAlaGluValArgMetAsp
 LysCysValGluAlaPheLysThrGlnIleSerLysIleArg
 ThrGlyArgAlaSerProSerLeuLeuAspGlyIleValVal
 GluTyrTyrGlyThrProThrProLeuArgGlnLeuAlaSer
 ValThrValGluAspSerArgThrLeuLysIleAsnValPhe
 AspArgSerMetSerProAlaValGluLysAlaIleMetAla
 SerAspLeuGlyLeuAsnProAsnSerAlaGlySerAspIle
 ArgValProLeuProProLeuThrGluGluArgArgLysAsp
 LeuThrLysIleValArgGlyGluAlaGluGlnAlaArgVal
 AlaValArgAsnValArgArgAspAlaAsnAspLysValLys
 AlaLeuLeuLysAspLysGluIleSerGluAspAspAspArg
 ArgSerGlnAspAspValGlnLysLeuThrAspAlaAlaIle
 LysLysIleGluAlaAlaLeuAlaAspLysGluAlaGluLeu
 MetGlnPhe

であり、185アミノ酸、分子量20,639であるこ
 とが確認され、上記で得られた蛋白に対応するも
 のであった。